

FACULTE DE MEDECINE DE PARIS

ANNEE 1969

THESE

N^o

814

POUR LE

DOCTORAT EN MEDECINE

(Diplôme d'Etat)

P A R

Françoise MACHEBOEUF

Née le 19 Novembre 1939 à TALENCE (Gironde)

Interne des Hôpitaux de Paris

PRESENTEE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE :

**ACTIVITE PHOSPHOLIPASIQUE DU SERUM HUMAIN
SUR DES PHOSPHATIDYL-ETHANOLAMINES EXOGENES**

Président : Mr. J. POLONOVSKI, Professeur.

ANNEE 1969

THESE

N^o

POUR LE

DOCTORAT EN MEDECINE

(Diplôme d'Etat)

P A R

Françoise MACHEBOEUF

Née le 19 Novembre 1939 à TALENCE (Gironde)

Interne des Hôpitaux de Paris

PRESENTEE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE :

**ACTIVITE PHOSPHOLIPASIQUE DU SERUM HUMAIN
SUR DES PHOSPHATIDYL-ETHANOLAMINES EXOGENES**

Président : Mr. J. POLONOVSKI, Professeur.



PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. Alajouanine (T.), Bénard (H.), Bernard (E.), Binet (L.), Bulliard (H.), Cathala (J.), Chabrol (E.), Chailley-Bert (P.), Cheymol (J.), Coste (F.), Debré (R.), Dechaume (M.), Galliard (H.), Gaudard d'Allaines (F. de), Gennes (L. de), Giroud (A.), Hazard (R.), Heuyer (G.), Lacomme (M.), Lamy (M.), Laroche (G.), Lelong (M.), Lévy (M^{lle} J.), Lévy-Solal (E.), Lian (C.), Maduro (R.), Marchal (G.), Mathieu (P.), Monod (R.), Moreau (R.), Moulonguet (P.), Pasteur Vallery-Radot, Petit-Dutaillis (D.), Piédelièvre (R.), Quénu (J.), Renard (G.), Senèque (J.), Strohl (A.), Tanon (L.), Turpin (R.), Verne (J.).

DOYEN Georges BROUET
 1^{er} ASSESSEUR Daniel BARGETON
 2^e ASSESSEUR Jean GOSSET

A. — CHAIRES DE SCIENCES FONDAMENTALES

	MM.
Anatomie	DELMAS (A.)
—	HUARD (P.)
à titre personnel	CABROL (Ch.)
— —	OLIVIER (G.)
Anatomie et Cytologie pathologiques	DELARUE (J.)
à titre personnel	NEZELOF (Ch.)
— —	ORCEL (L.)
Biochimie médicale	JAYLE (M.-F.)
— —	DESGREZ (P.)
— —	POLONOVSKI (J.)
Chimie Pathologique	SCHAPIRA (G.)
à titre personnel	CARTIER (P.)
— —	DREYFUS (J.-Cl.)
Biologie médicale (à titre personnel).	BOURLIÈRE (F.)
— —	HARTMANN (L.)
Biophysique médicale	BUGNARD (L.)
— —	DJOURNO (A.)
— —	DOGNON (A.)
à titre personnel	KELLERSHOHN (L.)
— —	GOUGEROT (L.)
— —	ROUCAYROL (J.-Cl.)
Cancérologie expérimentale	MATHÉ (G.)
Génétique fondamentale	LEJEUNE (J.)
Histologie et Embryologie	COUJARD (R.)
— —	TUCHMANN-DUPLESSIS (H.)
à titre personnel	RACADOT (J.)
Microbiologie	FASQUELLE (R.)
Bactériologie et Virologie	TOURNIER (P.)
à titre personnel	BARBIER (P.)
Parasitologie	LARIVIÈRE (M.)
Pathologie expérimentale et comparée	MERKLEN (F.-P.)
à titre personnel	LÆPER (J.)
Pharmacologie	BOISSIER (J.-R.)
—	LECHAT (P.)

	MM.
Physiologie	BARGETON (D.)
—	MALMEJAC (J.)
—	PARROT (J.)
à titre personnel	DEJOURS (P.)
Physiologie et biologie appliquée aux sports	SCHERRER (J.)

B. — CHAIRES DE SCIENCES CLINIQUES

1^o MÉDECINE

Biologie médicale.	FAUVERT (R.)
Histoire de la Médecine et de la Chirurgie	COURY (Ch.)
Hygiène et Médecine préventive.	BOYER (J.)
Médecine du Travail.	DESOILLE (H.)
Médecine légale, droit médical et déontologie	DEROBERT (L.)
Pathologie exotique.	BRUMPT (L.-C.)
Pathologie médicale.	BUGE (A.)
— —	BRICAIRE (H.)
— —	CORNET (A.)
— —	HOUSSET (E.)
— —	LAROCHE (Cl.)
à titre personnel	AZERAD (E.)
— —	BOUR (H.)
— —	BROCARD (H.)
— —	CAROLI (J.)
— —	FACQUET (J.)
— —	LAMBLING (A.)
— —	LAUNAY (Cl.)
— —	PAYET (M.)
— —	PERRAULT (M.)
— —	SIGUIER (F.)
— —	WORMS (R.)
— —	BCUVIER (J.)
Pathologie respiratoire.	TURIAF (J.)
Pathologie et Thérapeutique générales	MAURICE (P.)
Thérapeutique	LAMOTTE (M.)
Thérapeutique appliquée.	MARCHE (J.)

Chaires de Cliniques :

Clinique cardiologique (Boucicaut)	LENÈGRE (J.)
— — (Broussais)	SOULIÉ (P.)
Clinique dermatologique (Saint-Louis)	DUPERRAT (F.)
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques (Saint-Louis)	DEGOS (R.)
Clinique endocrinologique (Pitié)	DECOURT (J.)
Clinique des maladies infectieuses (Claude-Bernard)	MOLLARET (P.)
à titre personnel	BASTIN (R.)
Clinique des maladies mentales et de l'encéphale (Sainte-Anne)	DELAY (J.)
à titre personnel (neuro-psychiatrie)	PICHOT (P.)
Clinique des maladies du système nerveux (Salpêtrière)	CASTAIGNE (P.)
Clinique neurologique (Salpêtrière)	GARCIN (R.)
à titre personnel	LHERMITTE (F.)
Clinique de neuro-psychiatrie infantile (Salpêtrière)	MICHAUX (L.)

	MM.	
Clinique des maladies du sang (Broussais)	BERNARD (J.)	
à titre personnel (hématologie)	ANDRÉ (R.)	
— — —	BOUSSER (J.)	
— — —	DREYFUS (B.)	
Cliniques médicales	Bicêtre.	DEPARIS (M.)
	Broussais.	MILLIEZ (P.)
	Cochin.	PÉQUIGNOT (H.)
	Hôtel-Dieu	BARIETY (M.)
	Pitié.	DREYFUS (G.)
	Saint-Antoine.	BOUDIN (G.)
— — —	CONTE (M.)	
— — —	KOURILSKY (R.)	
Clinique médicale propédeutique (Broussais)	JUSTIN-BESANÇON (L.)	
Clinique thérapeutique médicale (Saint-Antoine)	LEMAIRE (A.)	
Clinique et Séméiologie médicales (Antoine-Chantin).	DOMART (A.)	
Séméiologie médicale (Lariboisière)	BOUVRAIN (Y.)	
— — — (Pitié)	RAMBERT (P.)	
— — — (Rothschild)	WOLFROMM (R.)	
Clinique d'Hydrologie et de Climatologie (Bichat).	DEBRAY (Ch.)	
à titre personnel	GIBERTON (A.)	
Clinique médico-sociale du diabète sucré et des maladies métaboliques (Hôtel-Dieu).	DEROT (M.)	
Clinique néphrologique (Necker)	HAMBURGER (J.)	
à titre personnel	RICHET (G.)	
— — —	CROSNIER (J.)	
Clinique de Génétique médicale (Enfants-Malades)	ROYER (P.)	
Clinique des maladies des enfants (Enfants-Malades).	MOZZICONACCI (P.)	
Clinique médicale infantile et de pédiatrie sociale (Enfants-Malades).	MARIE (J.)	
Clinique de pédiatrie (Trousseau)	BRISSAUD (H.)	
à titre personnel	LESOBRE (R.)	
Clinique de pédiatrie et de puériculture (Saint-Vincent-de-Paul)	THIEFFRY (S.)	
Hygiène et Clinique de la première enfance (Trousseau)	LAPLANE (R.)	
à titre personnel	POLONOVSKI (Cl.)	
Clinique de pneumo-phtisiologie (Laennec).	BROUET (G.)	
à titre personnel	KREIS (B.)	
— — —	MEYER (A.)	
Clinique de rééducation motrice.	GROSSIORD (A.)	
Electroradiologie	LEDOUX-LEBARD (M.)	
—	LEFEBVRE (J.)	
Radiologie médicale.	DESGREZ (H.)	
à titre personnel	FISCHGOLD (H.)	
— — —	TUBIANA (M.)	
— — —	CHERIGIE (E.)	
Clinique de rhumatologie médicale et sociale (Cochin).	DELBARRE (F.)	
Clinique rhumatologique (Lariboisière)	SÈZE (S. de)	
Clinique toxicologique (Fernand-Widal)	GAULTIER (M.)	

2^o CHIRURGIE

Anesthésiologie	VOURC'H (G.)
Pathologie chirurgicale	LAURENCE (G.)
— —	KUSS (R.)
— —	N...
à titre personnel	RAMADIER (J.)
Physiologie et pathologie obstétricales	MORIN (P.)
Technique chirurgicale et chirurgie expérimentale	MONSAINGEON (A.)

Chaires de Cliniques :

Clinique carcinologique (Gustave-Roussy)	DENOIX (P.)	
Clinique carcinologique chirurgicale (Necker)	REDON (H.)	
à titre personnel	BRÉHANT (J.)	
Cliniques chirurgicales	Beaujon	LORTAT-JACOB (J.-L.)
	—	BAUMANN (J.)
	Cochin	LÉGER (L.)
	Hôtel-Dieu	PATEL (J.)
	Saint-Antoine	GOSSET (J.)
	Salpêtrière	SICARD (A.)
Tenon	OLIVIER (Cl.)	
Clinique thérapeutique chirurgicale (Vaugirard)	ROUX (M.)	
Sémiologie et clinique chirurgicales (Broussais)	POILLEUX (F.)	
— — — (Saint-Louis)	DEBEYRE (J.)	
Clinique chirurgicale orthopédique et traumatologique (Cochin)	MERLE d'AUBIGNÉ (R.)	
— — — — (Foch)	PADOVANI (P.)	
— — — — (Beaujon)	CAUCHOIX (J.)	
Clinique traumatologique et orthopédique (Raymond-Poincaré)	JUDET (R.)	
Clinique de chirurgie infantile et orthopédique (Enfants-Malades)	FÈVRE (M.)	
à titre personnel	CHIGOT (P.-L.)	
Clinique de chirurgie cardio-vasculaire (Broussais)	DUBOST (Ch.)	
Clinique de chirurgie thoracique (Laennec)	MATHEY (J.)	
à titre personnel	GAUDART D'ALLAINES (Cl. de)	
Clinique chirurgicale et gynécologique (Broca)	HUGUIER (J.)	
Clinique obstétricale (Baudelocque)	LEPAGE (F.)	
— — (Saint-Antoine)	MERGER (R.)	
Clinique obstétricale et gynécologique (Port-Royal)	VARANGOT (J.)	
Clinique de neuro-chirurgie (Pitié)	DAVID (M.)	
à titre personnel	LEBEAU (J.)	
Clinique ophtalmologique (Cochin)	BRÉGEAT (P.)	
— — (Hôtel-Dieu)	OFFRET (G.)	
Clinique oto-rhino-laryngologique (Lariboisière)	AUBRY (M.)	
Clinique stomatologique (Salpêtrière)	CERNEA (P.)	
Clinique urologique (Cochin)	ABOULKER (P.)	
— — (Necker)	COUVELAIRE (R.)	

C. — PROFESSEURS SANS CHAIRE

MM.		MM.	
Anatomie	GILLOT (Cl.)	Médecine générale	AUSSANNAIRE (M.)
Anatomie pathologique . .	GOUYGOU (Ch.)	Maladies Infectieuses . . .	DUPONT (V.)
Bactériologie	CHRISTOL (D.)	Neuro-psychiatrie	TARDIEU (G.)
Bactériologie	LE MINOR (L.)	Pédiatrie	ROSSIER (A.)
Biochimie médicale	{ CARTIER (P.) GONNARD (P.) NORDMANN (J.)	Physique médicale	{ COURSADET (J.) GREMY (F.) PELLERIN (P.)
Chirurgie	CERBONNET (G.)	Physiologie	{ DURAND (J.) GIRARD (Fr.) HUGELIN (A.)
Hématologie	{ BESSIS (M.) BILSKI-PASQUIER (G.)	Stomatologie	CHAPUT (M ^{me} A.)
Hygiène	{ BLANCHER (G.) CORRE-HURST (M ^{me} L.)	Pharmacologie	SCHMITT (H.)
Médecine légale	{ CECCAL P. HADENGUE (A.) FOURNIER (E.)		

D. — PROFESSEURS DÉTACHÉS DANS LES UNIVERSITÉS ÉTRANGÈRES

	MM.
Pathologie chirurgicale	RUDLER (J.) Pr. s. ch.

E. — PROFESSEURS ASSOCIÉS

Hormonologie	MORICARD (R.)
Statistique médicale et épidémiologie	SCHWARTZ (D.)
Néphrologie	MAXWELL (M.)

Secrétaire général de la Faculté	M. LENA (J.)
Conseiller administratif	Mlle CHAINTREUIL (G.)
Conservateur en Chef de la Bibliothèque	M. le Docteur HAHN (A.)
Conservateur du Musée d'Histoire de la Médecine	
Conservateurs	{ Mme FORGET (F.), Miles DUMAITRE (P.), LAURENT (H.), LE NOIR (G.)
Bibliothécaires	{ Mmes CONTET (J.), Miles DUROZOY (M.-F.), ROBERGE (D.), LE QUANG LINH (G.), REUGE (M.)

Par délibération en date du 9 décembre 1798, l'Ecole a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551519_0019

A la mémoire du Professeur MACHEBOEUF, mon père ,

A ma mère,

A mes soeurs et beaux-frères,

A mes amis.

Au Professeur Jacques POLONOVSKI

Professeur de Chimie Biologique à la Faculté
de Médecine de Paris.

qui m'a fait l'honneur de diriger et
de présider cette thèse.

Avec ma profonde reconnaissance.

A Madame ETIENNE

Docteur es sciences

qui a bien voulu m'accueillir et
guider ce travail.

Au Docteur MAITROT

avec ma vive reconnaissance.

A mes Maîtres d'Externat des Hôpitaux de Paris :

- Monsieur le Docteur P. LANCE
Chirurgien des Hôpitaux de Paris.
- Monsieur le Docteur L. ROUQUES
Médecin honoraire des Hôpitaux de Paris.
- Monsieur le Docteur P. UHRY
Médecin des Hôpitaux de Paris.
- Monsieur le Docteur E. JOSEPH
Ophtalmologiste des Hôpitaux de Paris.
- Monsieur le Professeur H. DESGREZ
Professeur à la Faculté de Médecine de Paris.
- Monsieur le Professeur J. DAUSSET
Professeur à la Faculté de Médecine de Paris.
- Monsieur le Professeur J. POLONOVSKI
Professeur à la Faculté de Médecine de Paris.

P L A N

- INTRODUCTION
- MATERIELS ET METHODES UTILISES
 - les sérums
 - le substrat
 - la trypsine
 - diverses méthodes employées
- MISE AU POINT DES CONDITIONS TECHNIQUES
- RESULTATS :
 - Chez les sujets normaux
 - sans trypsine
 - avec trypsine
 - Dans certains cas pathologiques :
 - sans trypsine
 - avec trypsine
- CONCLUSION.

I N T R O D U C T I O N

Découvertes par les travaux de DELEZENNE et FOURNEAU sur les lecithinases du venin de serpent, les phospholipases ont été trouvées depuis dans de nombreux tissus animaux, végétaux, et chez les micro-organismes. Elles font l'objet de travaux récents qui mettent en évidence leur rôle prépondérant dans de multiples phénomènes biologiques.

Leur spécificité peut concerner la nature du substrat et la position de l'acide gras libéré. Elle varie, ainsi que les conditions optima d'activité suivant l'origine tissulaire et le siège de leur synthèse à l'intérieur de la cellule. Les extraits pancréatiques humains ont une activité phospholipasique élevée, sur les céphalines et les lecithines, de type A_2 : l'acide gras en C_2 étant spécifiquement libéré (1).

DOIZAKI et ZIEVE ont étudié l'activité phospholipasique de sérum d'hommes normaux et atteints de pancréatite aiguë sur une émulsion de lécithine d'oeuf. La technique (2) de dosage par turbimétrie est basée sur la propriété clarifiante des lysolecithines. Les auteurs constatent l'absence d'activité pour les sujets normaux tandis qu'une formation de lysodérivés est obtenue pour les sujets atteints de pancréatite aiguë (3).

Dans le sérum ou le plasma humain, l'activité phospholipasique s'exerçant sur des phosphatidyl ethanolamines exogènes est à distinguer du rôle joué par d'autres phospholipases qui sont :

- La phospholipase post-héparine (4) :

Cet enzyme n'existe pas normalement dans le sérum. Elle n'y est présente qu'après injection d'héparine. L'héparine ajoutée in vitro est sans action. Il semble s'agir d'un enzyme tissulaire qui sous l'effet d'une certaine concentration d'héparine passerait dans la circulation.

La phospholipase post-héparine humaine n'agit pas sur les phospholipides des lipoprotéines : son effet ne s'observe que sur des émulsions artificielles de phospholipides. Elle hydrolyse phosphatidyl choline et phosphatidyl-éthanolamine, le pH optimum étant 9,2. C'est une phospholipase A₁ (5). Elle n'a pu être séparée de la lipoprotéine lipase post-héparine.

- L'acyl-transférase :

Cet enzyme est normalement présent dans le sérum. LEBRETON et PANTALEON montrèrent que les phospholipides étaient la source des acides gras intervenant dans l'estérification du cholestérol.

ETIENNE et POLONOVSKI -(6) étudièrent l'évolution des lipides au cours de l'incubation du sérum à 37°C et montrèrent une diminution des lécithines, une augmentation du cholestérol estérifié et de la glycéro-phosphoryl-choline. Le taux de sphingomyélines et des céphalines reste inchangé. L'étude a porté également sur l'évolution des lipoprotéines isolées.

Des travaux de GLOMSET (7 - 8 - 9) et collaborateurs concernent cet enzyme dont l'activité s'exerce au niveau de certaines lipoprotéines plasmatiques selon le schéma :



Les lipoprotéines concernées sont les HDL et pour une part moins importante les LDC.

L'acide gras libéré est en position 2, essentiellement de l'acide linoléique et va se fixer sur le cholestérol .

C'est dans le plasma que cet enzyme est trouvé en plus grande quantité d'où il n'a été que partiellement purifié. Il serait synthétisé par le foie.

Après avoir précisé les conditions techniques de la mise en évidence de l'activité phospholipasique du sérum sur des phosphatidyl ethanolamines (P.E.) exogènes, il a paru également intéressant de comparer les résultats obtenus chez des sujets normaux et dans des cas pathologiques d'observer l'effet de l'adjonction de trypsine au milieu d'incubation.

M A T E R I E L

I - LES SERUMS

Les sérums des sujets normaux, au nombre d'une vingtaine sont ceux de donneurs à la transfusion sanguine de l'Hôpital Saint-Antoine (Pr. ANDRE).

Les malades sont hospitalisés dans des services du même hôpital (Pr. CAROLE, Pr. CONTE).

Les prélèvements sont effectués le matin, le sujet étant à jeun. Le sérum est recueilli quelques heures plus tard et conservé à + 4°C jusqu'au lendemain matin où sont mises en route les incubations.

II - LE SUBSTRAT (10)

Il est constitué de phosphatidyl éthanolamines exogènes et marquées au niveau de l'atome de P par du $^{32}\text{P}^*$.

Préparation de l'extrait lipidique :

On injecte à 2 ou 3 rats adultes de 200 à 300 grammes en intraveineuse du phosphate radioactif à raison de 5 millicuries par rat. Quinze heures plus tard les animaux sont sacrifiés. C'est à partir des foies que l'on extrait des lipides : les foies sont broyés grâce à un ultra-turrax dans du méthanol (1 vol.) auquel on ajoute ensuite du chloroforme ($\frac{1}{2}$ vol.). Les lipides sont extraits par la technique de FOLCH PI (11).

Isolément de phosphatidyl éthanolamines pures :

L'extrait lipidique est à basse température -20° mis pendant 15 heures en présence d'acétone anhydre qui entraîne les graisses neutres. Après filtration les phospholipides, insolubles dans l'acétone, sont mis en solution dans du chloroforme. Ce solvant est évaporé et l'opération renouvelée une fois.

1 - Fractionnement des phospholipides :

La solution chloroformique de phospholipides est fractionnée par chromatographie sur colonne d'acide silicique (MALLINKRODT 100 Mesh). On élue successivement par du chloroforme et des mélanges chloroforme-méthanol respectivement 4/1, 3/2, 1/1 vol/volume.

Le chloroforme pur élimine les graisses neutres qui pourraient être encore présentes.

Les céphalines, les lécithines, les sphingomyélines sont en grande majorité respectivement dans les mélanges 4/1, 3/2, et 1/1.

Les solvants sont évaporés et les phospholipides mis en solution dans du chloroforme.

2 - Contrôle de la pureté des solutions de phospholipides.

On procède à une chromatographie en couche mince ($1/4$ mm d'épaisseur) de gel de silice (gel de silice G, selon STAHL, chez MERCK) sur plaques de verres (carrées de 20 cm² de côté).

On dépose les phospholipides en solution dans un mélange chloroforme-méthanol (1/1 vol/vol), en quantité telle que le nombre de coups/minute soit suffisant à l'impressionnement d'un auto-radiogramme en 4 heures.

La phase est neutre composée de chloroforme, méthanol et eau (65, 25, 4 vol/vol).

La migration, ascendante en cuves de verre, dure une heure.

Le film utilisé pour l'auto-radiographie est un film de sécurité Kodak, support Estar 18x24 cm.

L'auto-radiogramme révèle l'emplacement des différents phospholipides : le gel de silice correspondant à chaque spot est recueilli dans une coupelle métallique et sa radioactivité est évaluée par un compteur de Geiger.

Si le rapport
$$\frac{\text{radioactivité phosphatidyl ethanolamines (PE)}}{\text{radio (lyso PE + PE)}}$$

d'une solution chloroformique atteint 95 %, celle-ci est considérée comme une solution pure de phosphatidyl-éthanolamines. Les solutions pures de céphalines marquées réunies, constituent le substrat.

On dose le phosphore et évalue la radioactivité du substrat : l'activité spécifique trouvée est voisine de 3.000 coups/minute et par microgramme de phosphore.

Le substrat doit être utilisé lorsque sa préparation date de moins de quinze jours.

III - LA TRYPSINE

employée est sous la forme d'une poudre lyophilisée de marque SIGMA.

METHODES UTILISEES DANS LA DETERMINATION DE L'ACTIVITE
PHOSPHOLIPASIQUE (10)

I - DANS UN PREMIER TEMPS, ON MET EN PRESENCE LE SUBSTRAT ET LE SERUM
PENDANT DES TEMPS D'INCUBATION VARIABLES A 37°C.

Le substrat est dilué de telle sorte que 100 μ l de solution chloroformique contiennent 15 μ g de phosphore. Il est réparti dans des tubes à hémolyse à raison de 100 μ l par tube. Le solvant est évaporé. A chaque tube on ajoute dans l'ordre 100 μ l d'éther, 100 μ l de tampon tris 0,05 M à pH 7,2. L'éther seul est évaporé et les PE sont mises en suspension dans le tris- 100 μ l de sérum sont ajoutés à chaque tube qui est aussitôt après placé dans une étuve à 37°C.

Pour chaque sérum, un des temps d'incubation étudiés est nul : l'activité enzymatique est arrêtée aussitôt après la réalisation du mélange substrat-sérum. Il sera discuté des autres temps d'incubation dans la mise au point des conditions techniques.

Dans des tubes témoins de l'activité phospholipasique, le sérum est remplacé à volume égal par du tampon tris 0,05 M ou pH 7,2. La suite des opérations est identique pour tubes témoins et non témoins.

Si on observe l'activité enzymatique en présence de trypsine, celle-ci est ajoutée au sérum en quantité telle que la concentration pondérale de trypsine par rapport aux protéines contenues dans 100 μ l de sérum soit de 1 ou 3 ‰ suivant l'expérience, c'est à dire faible. Pour obtenir la concentration de 3 ‰, on ajoute dans chaque tube 20 μ l de tampon tris 0,05 M pH 7,2, contenant 20 μ g de trypsine.

Le temps de préincubation est le temps qui s'écoule entre l'adjonction de trypsine au sérum et la mise en route des incubations. Il variera suivant les expériences et sera précisé.

Pour les témoins de l'action de la trypsine sur l'activité phospholipasique du sérum, le sérum est remplacé par du tampon tris 0,05 M pH 7,2 , à volume égal et additionné de trypsine.

II - FIN DE L'INCUBATION

L'action enzymatique est stoppée grâce à l'adjonction de 10 volumes (soit 2 ml) d'un mélange chloroforme méthanol (1/2 vol/vol). Les protéines précipitent, on procède à l'extraction lipidique ; le précipité après centrifugation est encore lavé à 2 reprises par dix fois son volume du même mélange.

Les surnageants sont recueillis dans des fioles rodées, les solvants évaporés. Les lipides sont mis en solution dans 2 ml de mélange chloroforme méthanol (1/1 vol/vol). 0,2 ml de cette solution sont évaporés dans une coupelle et passés au compteur de Geiger.

III - DETERMINATION DE L'ACTIVITE PHOSPHOLIPASIQUE.

1 - Chromatographie :

On dépose une quantité de solution lipidique telle que le nombre de coups par minute soit suffisant à l'impressionnement d'un autoradiogramme en 15 heures.

Le matériel et les autres conditions sont identiques à ceux de la chromatographie opérée pendant la préparation du substrat.

2 - Autoradiographie :

Le film utilisé est un film de sécurité Kodak, support Estar 18 x 24 cm.

L'autoradiogramme révèle l'emplacement des spots de PE et de Lyso PE, ces dernières migrant moins rapidement que les premières.

Le gel de silice correspondant à chaque spot est recueilli dans une coupelle métallique et sa radioactivité est évaluée au compteur de Geiger.

Ainsi le pourcentage
$$\frac{\text{Radioactivité Lyso PE}}{\text{Radioactivité (lyso PE + PE)}}$$

est calculé pour chaque temps d'incubation; connaissant la quantité totale de $^{32}\text{P}^*$ contenue dans chaque tube, on en déduit le nombre de millimicromoles de phosphore incluses dans la lysocéphaline formée.

Les résultats sont exprimés en millimicromoles de lysocéphaline formées pour 100 μl de sérum, en précisant le temps d'incubation correspondant.

MISE AU POINT DE LA TECHNIQUE

Elle consiste à déterminer :

- le pH optimum
- le tampon le plus favorable à l'activité enzymatique
- le rapport optimum entre les quantités de substrat et de sérum donc d'enzyme mis en présence,
- les temps d'incubation.

I - LE pH OPTIMUM

Les résultats obtenus sont les meilleurs pour des pH compris entre 5 et 8 nous avons choisi un tampon à pH 7,2.

II - CHOIX DU TAMPON.

Nous avons comparé les résultats obtenus avec deux tampons à pH 7,2 : tampon tris 0,05 M , tampon glycine (tab.1) Le tampon tris sera préféré au tampon glycine.

III - RAPPORT ENZYME-SUBSTRAT

Le nombre de millimicromoles de Lyso PE formées avec une quantité fixe de sérum (100 μ l) et un même temps d'incubation (6 heures) a été mesuré (fig. 1) : une quantité de PE de 0,5 micromoles apparut comme un minimum pour que le substrat ne soit pas un facteur limitant.

IV - CHOIX DES TEMPS D'INCUBATION

A - En l'absence de trypsine :

L'activité du sérum humain est relativement faible : en 15 ou 30 minutes, la quantité de Lyso PE est trop faible pour qu'une mesure soit faite avec précision. En 1 heure la quantité de Lyso PE formée est suffisante. Un temps d'incubation de 6 heures a l'avantage d'augmenter la quantité de Lyso PE formée mais celle-ci n'est plus proportionnelle au temps d'incubation. Nous avons poursuivi l'incubation pendant 24 heures : les résultats obtenus n'augmentent pas en proportion de la durée de l'incubation et ne sont guère supérieurs à ceux obtenus en 6 heures.

Nous avons généralement choisi de faire des mesures pour des temps de 0,1 et 6 heures.

B - En présence de trypsine :

L'activité phospholipasique est 3-4 fois plus élevée qu'en l'absence de trypsine (pour une concentration pondérale de 3 ‰ par rapport aux protéines du sérum). Des temps d'incubation de 15, 30, 60 minutes sont suffisants. Pour des temps supérieurs, les céphalines sont transformées en lyso-céphalines dans leur presque totalité.

Pour deux sérums, différents temps de préincubation ont été étudiés : l'activité décroît lorsqu'on augmente le temps de préincubation (tab. 2, fig. 2).

Nous avons donc choisi de mettre la trypsine au temps 0 de l'incubation de façon à réduire le plus possible le temps de préincubation.

Sérum de	Tampons pH 7,2	Temps d'incubation en heures		
		1	6	24
Monsieur N...	Tris 0,05 M	42	97	197
	Glycine	23	82	132
Madame F...	Tris	41	67	100
	Glycine	36	45	62

Tableau n° 1 : Variations suivant le tampon utilisé . Comparaison des résultats obtenus, pour deux sérums de sujets normaux, en présence de tampons tris et glycine à pH 7,2.

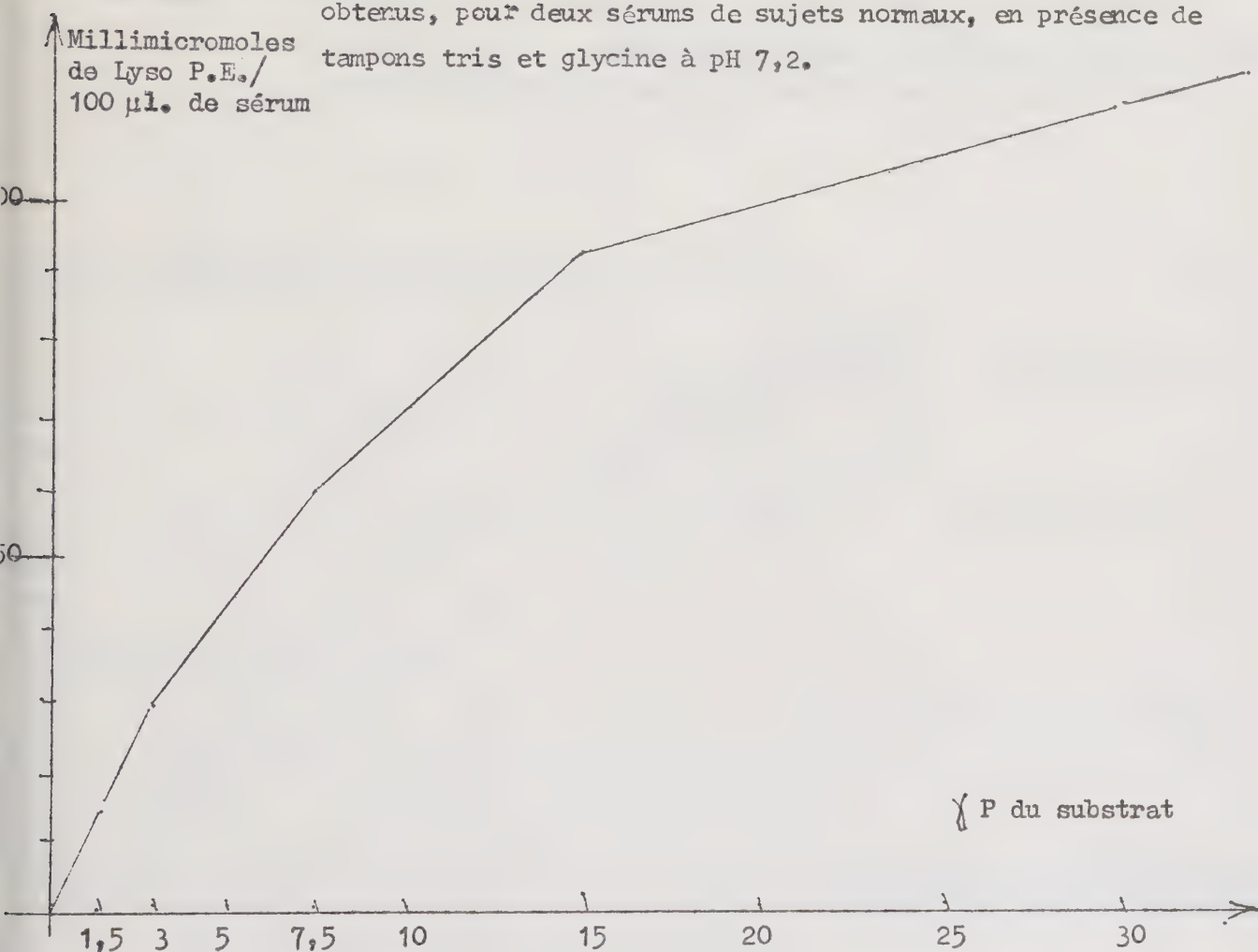


Figure 1 : Variations suivant la quantité de substrat; en abscisse : quantité de substrat en µ gramme de phosphore ; en ordonnée : nombre de millimicromoles de lyso PE pour 100 µl de sérum, un temps d'incubation de 6 heures, en l'absence de trypsine.

Sérum de	Temps d'incubation en minutes	Temps de préincubation en heures			
		0	1	6	18
Mademoiselle M...	60	135	132	110	100
	360	310	282		235
Monsieur B...	15	78	69	52	
	30	120	110	90	
	60	168	166	141	

Tableau n° 2 : Résultats obtenus chez deux sujets normaux en présence de trypsine à 3‰. Variations suivant la durée de la préincubation nombre de millimicromoles de lyso PE pour 100 μ l de sérum.

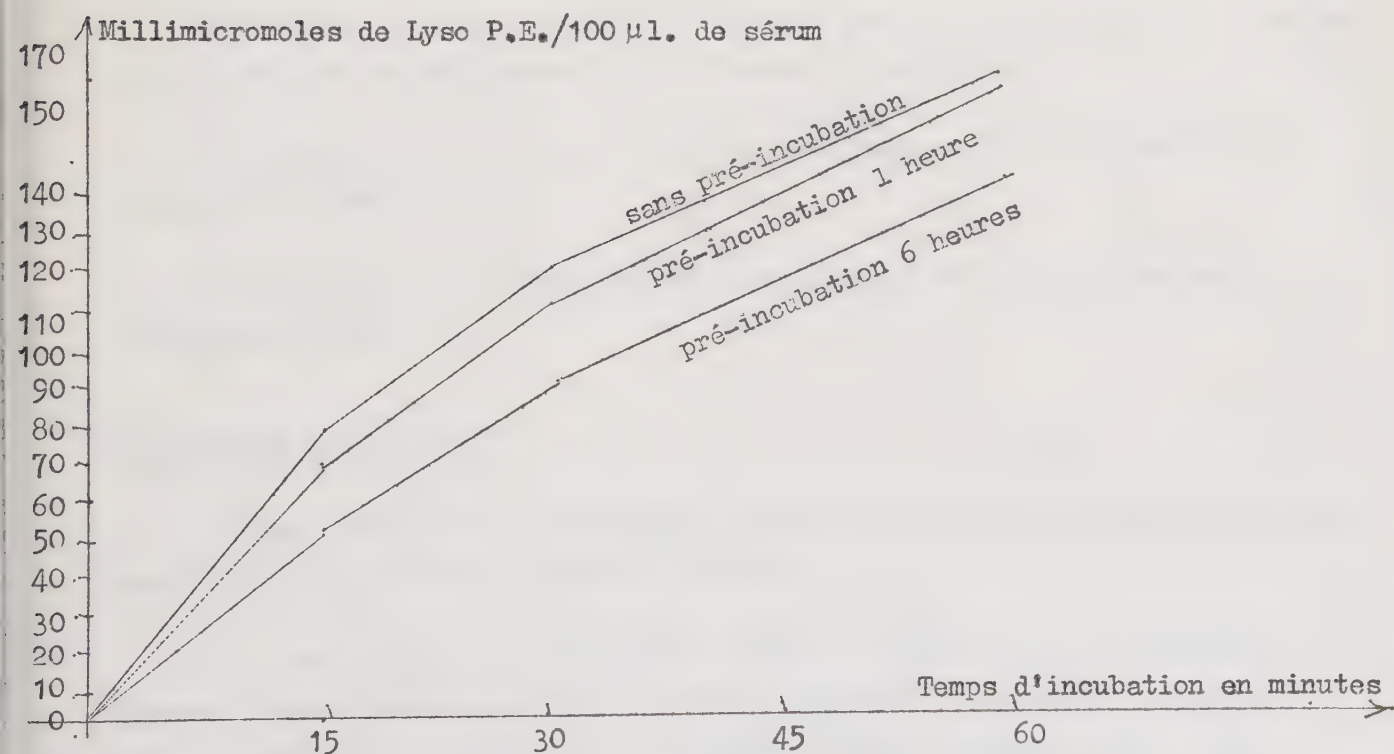


Figure N° 2 - Résultats obtenus chez Monsieur B... sujet normal en présence de trypsine à 3‰. pour différents temps de préincubation; en abscisse : temps d'incubation en minutes; en ordonnée : nombre de millimicromoles de lyso PE/100 μ l sérum.

RESULTATS OBTENUS CHEZ LES SUJETS NORMAUX

EN L'ABSENCE DE TRYPSINE

On constate (tabl. 3) que le nombre de millimicromoles de lyso céphalines obtenu est faible et varie assez sensiblement d'un sérum à l'autre. Par contre, la différence entre les chiffres obtenus pour 6 et 1 heures d'incubation est moins variable d'un sujet à l'autre.

Les moyennes obtenus pour 100 μ l de sérum sont de 17 et 52 millimicromoles de Lyso PE pour respectivement 1 et 6 heures d'incubation.

On a retranché les nombres de millimicromoles de Lyso PE correspondant aux temps d'incubation nuls.

La vitesse de la réaction décroît rapidement après la première heure d'incubation (fig. 3).

EN PRESENCE DE TRYPSINE

On observe l'absence de formation de lysocéphaline dans les tubes témoins contenant de la trypsine mais pas de sérum.

Il y a une grande variabilité d'un sérum à l'autre dans les résultats obtenus (tab. 4) mais dans tous les cas l'activité est nettement augmentée par l'adjonction de trypsine à une concentration pondérale de 3‰ par rapport aux protéines du sérum. Cette dose est nécessaire car l'augmentation d'activité est moins sensible, à la concentration de 1‰ (tableau 4 fig. 4).

Des chiffres très différents peuvent être trouvés pour deux sérums dont les résultats en l'absence de trypsine étaient très voisins.

L'autoradiogramme de Monsieur G... (résultats tab. 4) est reproduit dans la figure 5, montrant l'aspect obtenu en présence et en l'absence de trypsine, les autres conditions étaient identiques.

Des temps d'incubation inférieurs à 15 minutes n'ont pas été étudiés mais pour des temps supérieurs on peut constater que le nombre de millimicromoles de Lysocéphaline n'augmente pas proportionnellement au temps d'incubation (fig. 2).

	Temps d'incubation en heures	
	1	6
Monsieur V...	32	58
Madame M...	30	52
Monsieur R...	2	19
Mademoiselle V...	16	43
Madame N...	58	87
Monsieur T...	25	46
Madame R...	32	50
Mademoiselle A	5	27
Monsieur B...	9	21
Monsieur Q...	18	67
Madame S...	19	57
Madame G...	4	14
Madame N...	20	55
Monsieur Y...	4	24
Monsieur J...	5	29
Mademoiselle T (fig. 3)	29	63
Monsieur B...	1	22
Madame C...	6	19
Mademoiselle M...	5	31
Monsieur G...	29	52

TABLEAU N° 3 : Résultats obtenus chez les sujets normaux en l'absence de trypsine.

Nombre de millimicromoles de Lyso PE/100 μ l de sérum.

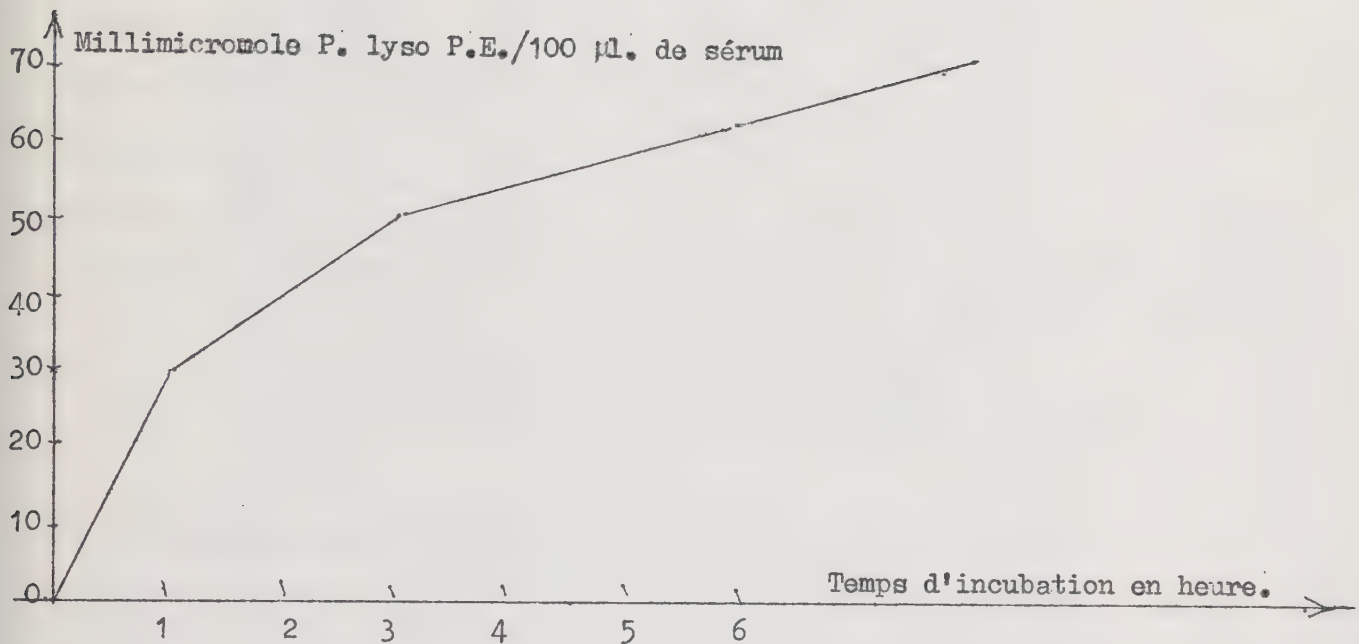


Figure 3 : Variations chez un sujet normal du nombre de millimicromoles de Lysocéphalines en fonction du temps d'incubation, en l'absence de trypsine.

en abscisse : nombre de millimicromoles de lysocéphaline/100 µl de sérum

en ordonnée : temps d'incubation en heures.

	Temps d'incubation en heures					
	S	ST 1 ¹ /‰	ST 3 ¹ /‰	S	ST 1 ⁶ /‰	ST 3 ⁶ /‰
Madame G... (fig. 4)	4	20	39	20	58	126
Monsieur J...	5		106	29		218
Monsieur G ... (fig.5)	29		72	52		198
Mademoiselle M...	30		135	93		310
Monsieur B...	48		168	73		

Tableau N° 4 : Comparaison chez des sujets "normaux" entre l'activité du sérum en l'absence (S) et en présence de trypsine à 1‰ (ST 1‰) et 3‰ (ST 3‰), sans préincubation.
Nombre de millimicromoles de Lyso PE/100 µl de sérum.

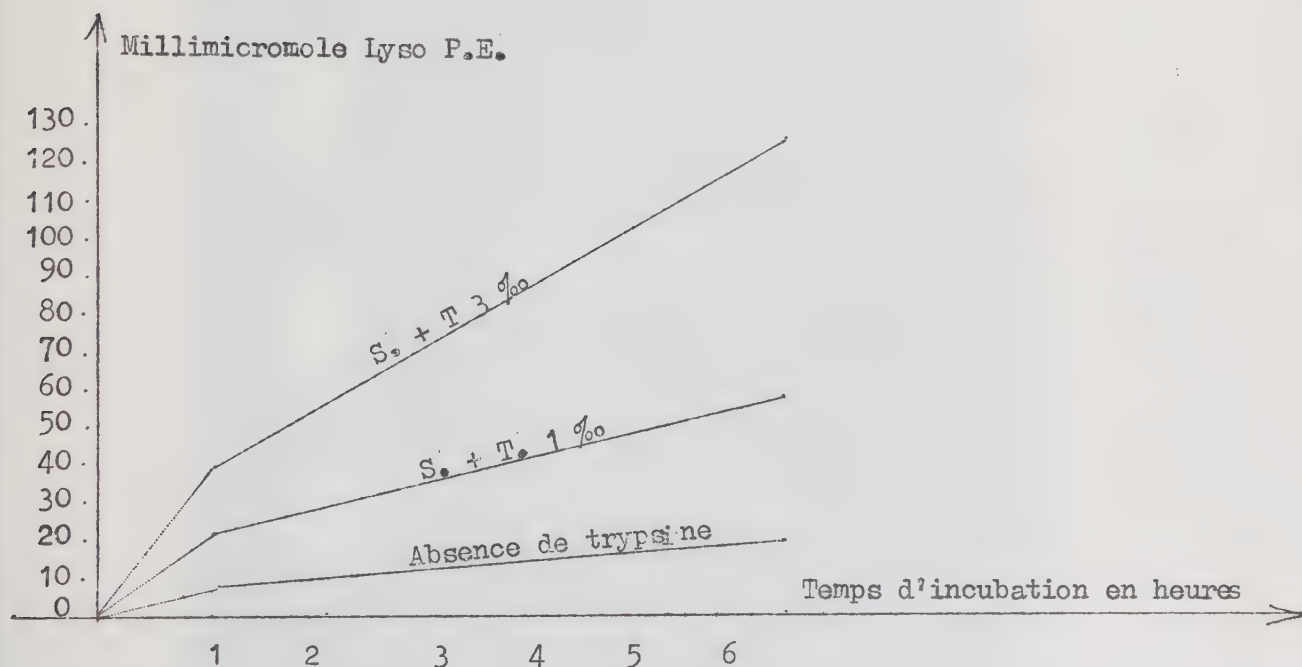


Figure 4 : Différentes concentrations de trypsine : résultats obtenus chez Madame G... sujet normal en l'absence et en présence de trypsine à 1 et 3‰ sans préincubation.
en abscisse : nombre de millimicromoles de Lyso PE/100 µl de sérum
en ordonnée : temps d'incubation en heure.

Monsieur G,

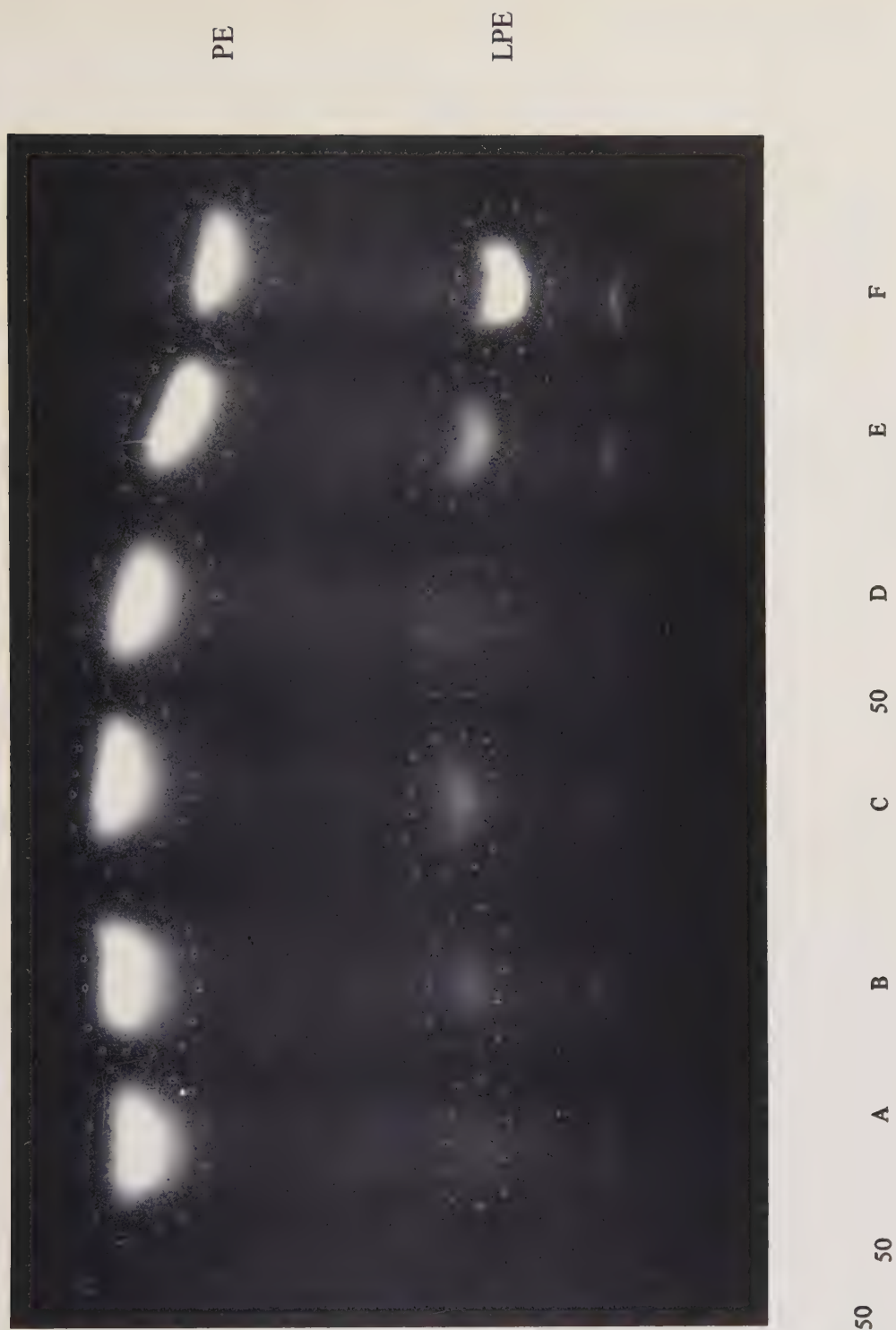


Figure 5 - Autoradiogramme de Monsieur G.... sujet normal

Temps d'incubation
en heure

0
1
6

Absence de trypsine

A
B
F

Sérum : trypsine 3 p.1000
sans préincubation

D
E
F

RESULTATS OBTENUS DANS QUELQUES CAS PATHOLOGIQUES

Les malades choisis sont pour la plupart atteints d'affections hépatiques et pancréatiques : on connaît le rôle du foie et du pancréas dans le métabolisme lipidique et l'importance de la synthèse de phospholipases à leur niveau.

Les malades ayant une cirrhose éthylique présentaient un ictère, des signes d'hypertension portale.

Le patient présentant un syndrome de Zieve était en période évolutive lors de l'examen (I2 - I3 - I4 - I5).

L'étiologie de la maladie de Weber-Christian chez Monsieur D... est attribuée à une pancréatite chronique (I6 - I7 - I8). Ce malade, mineur de fond, né en 1923 à des habitudes d'intempérance depuis plus de 20 ans. Un tableau clinique et biologique de pancréatite chronique précèdera de quelques mois l'apparition en juillet 1967 des nodules sous-cutanés. L'évolution se compliquera de thrombose, d'hypertension portale. Des périodes de recrudescence des signes cliniques et biologiques, notamment en janvier 1968, alternent avec d'autres où l'on constate une nette amélioration (avril 68).

RESULTATS OBTENUS

En dehors de la maladie de Weber-Christian il est à remarquer que les résultats obtenus (tableau n° 5) ne diffèrent pas sensiblement de ceux obtenus chez les sujets normaux.

Rappelons que la moyenne obtenue pour les sujets normaux est de 17 et 42 millimicromoles de lysocéphalines pour respectivement 1 et 6 heures d'incubation.

Pour les deux sérums dont l'activité phospholipasique a été évaluée en présence de trypsine à 3‰ sans préincubation, les chiffres obtenus ont été nettement augmentés par l'adjonction de trypsine (tableau N° 6).

Pour la maladie de Weber-Christian associée à une pancréatite chronique : l'activité phospholipasique est trouvée en novembre 1967 et surtout en janvier 1968 nettement supérieure à celle du sujet normal dans les mêmes conditions (tableau n° 7). A ces dates, les chiffres obtenus sont supérieurs à ceux d'avril 1968 en présence de trypsine.

Maladie	Temps d'intervention en h.		Différence entre les chiffres obtenus en 6 et 1 h d'incubation
	1	6	
Cirrhose éthylique	5	18	13
Cirrhose éthylique	46	57	11
Cirrhose éthylique	28	39	11
Cirrhose éthylique	45	63	18
Cirrhose éthylique	36	76	40
Syndrome de Zîève	24	III	87
Pancréatite chronique	34	102	68
Pancréatite chronique	19	34	15
Pancréatite chronique	19	39	20
Weber Christian	289		
Leucémie aiguë myéloblastique	1	20	19
Anémie aiguë sidéroblastique	39	86	47

Tableau n° 5 - Résultats obtenus dans les cas pathologiques

Nombre de millimicromoles de lysocéphalines pour 100 l de
sérum, en l'absence de trypsine.

Maladie	Temps d'incubation en heures			
	1		6	
	S	ST	S	ST
Leucémie aiguë myéloblastique	1	316	20	404
Anémie aiguë sidéroblastique	39	266	86	376

Tableau n° 6 - Dans deux cas pathologiques, comparaison de l'activité phospholipasique en présence et en l'absence de trypsine à 3°/° sans préincubation

S sérum seul

ST sérum en présence de trypsine

Nombre de millimicromoles de lysocéphalines pour 100 µl de sérum

Date de l'examen	Temps d'incubation en minutes			
	5	15	30	60
Novembre 1967				149
Janvier 1968		149	243	289
Avril 1968	S ST	S ST		S ST
	7 30	22 50		40 118

Tableau n° 7 - Résultats obtenus dans la maladie de Weber-Christian

Nombre de millimicromoles de lysocéphalines/100 µl de sérum

S sérum en l'absence de trypsine

ST en présence de trypsine

à 3°/° sans préincubation.

C O N C L U S I O N

Cette étude a porté sur l'activité phospholipasique du sérum humain, en l'absence et en présence de trypsine, sur des phosphatidyl-éthanolamines (PE) exogènes.

L'activité obtenue est 3 ou 4 fois plus élevée en présence qu'en l'absence de trypsine et on observe d'assez grandes variations d'un sérum à l'autre.

Pour expliquer l'action de la trypsine (19-20), on peut émettre deux hypothèses :

- la trypsine agirait en inactivant un inhibiteur de la phospholipase étudiée qui existerait normalement dans le sérum;
- ou bien la phospholipase se formerait sous l'effet de la trypsine à partir d'un précurseur inactif.

De HAAS et ses collaborateurs (21) ont récemment mis en évidence dans le pancréas de Porc, l'existence d'un précurseur de la phospholipase A_2 et son activation par digestion tryptique.

Quelque soit le mécanisme en cause, la présence de trypsine démasque une activité phospholipasique qui préexiste comme une prophospholipase.

La méthode de mesure que nous proposons est donc la suivante :

Six échantillons de 100 μ l de sérum sont mis en incubation avec 0,5 micro-moles de substrat marqué au 32 P, préparé comme nous l'avons proposé page 5 et émulsionné dans 100 microlitres de tampon tris 0,05 M à pH 7,2.

	A	B	C	D	E	F	G	H
Sérum	100 µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	0	0
Emulsion de substrat	100 µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl
Tampon tris	0	0	0	0	0	0	100µl	100µl
Trypsine	0	0	0	+	+	+	-	+
Durée d'incubation	0	1 h	6 h	0	15 mn	30 mn	60 mn	30 mn

Les incubations sont arrêtées par addition de 2 ml d'un mélange de méthanol chloroforme (2/1 vol/vol). Après centrifugation, les extraits lipidiques sont séchés et dissous dans 2 mls de mélange méthanol chloroforme (1/1 vol/vol). Une portion aliquote contenant 2.500 à 3.000 coups/mn est déposée sur une plaque de chromatographie en couche mince. La chromatographie et les mesures de radioactivité des taches de phosphatidyl-éthanoamine et lysophosphatidyl-éthanoamine sont effectuées selon les conditions décrites page 9 .

Les résultats obtenus sont les suivants :

En l'absence de trypsine, l'activité phospholipasique des vingt sérums de sujets normaux étudiés est faible : en moyenne 17 et 42 millimicromoles de lyso PE pour 100µl de sérum et respectivement 1 et 6 heures d'incubation à 37°C.

Dans les cas pathologiques étudiés : 5 cirrhoses éthyliques, 3 pancréatites chroniques, 1 syndrome de Ziève, 1 anémie sidéroblastique, 1 leucémie aiguë myéloblastique, les résultats ne diffèrent pas sensiblement de la normale. Une seule exception : pour le sujet présentant outre une pancréatite chronique, une maladie de Weber-Christian, les chiffres obtenus ont été parfois nettement supérieurs à la normale, atteignant 289 millimicromoles de lyso PE pour 100µl de sérum et une heure d'incubation à 37°C, parfois sensiblement normaux. Ceci

pose le problème d'une corrélation entre l'atteinte du tissu adipeux sous-cutané et l'augmentation de l'activité phospholipasique étudiée et montre la nécessité de renouveler l'examen au cours de l'évolution.

En présence de trypsine à faible concentration : nous n'avons qu'un très petit nombre de cas où l'activité phospholipasique a été mesurée par l'addition de trypsine. Les chiffres obtenus chez les individus normaux sont assez variables. Il est donc intéressant d'estimer la teneur en phospholipase directement active et également en prophospholipase. Cette recherche aurait un intérêt plus particulier dans les syndromes pancréatiques, le pancréas étant probablement à l'origine de la prophospholipase sanguine.

Vu, le Président de thèse :

Vu, le Doyen de la Faculté :

J. POLONOVSKI

G. BROUET

Vu et permis d'imprimer

le Recteur de l'Académie de Paris

J. ROCHE

B I B L I O G R A P H I E

- 1 - LLM. VAN DEENEN, GH. de HAAS, C.H.Th. HEENSKERK-
Hydrolysis of synthetic mixed-acide phosphatides by phospholypase A from human pancreas.
Biochem. Biophys. Acta. 1963 - 67 - 295.

- 2 - W.M. DOIZAKI, L. ZIEVE.-
Turbidimetric assay for phospholypase A.
J. Lab. Clin. Med 1964 - 63 - 524.

- 3 - W.M. DOIZAKI, L. ZIEVE.-
Turbidimetric serum phospholipase A activity in acute pancreatitis.
J. Lab. Clin. Med. 1966 - 67 - 108.

- 4 - K. KOUMANOV , R. INFANTE , J. POLONOVSKI, O. DONON.-
Etude comparative des phospholipases post-héparine du plasma d'homme et de rat.
Bull. Soc. Chim. Bio. 1968 - 50 - 1425.

- 5 - W.C. VOGEL, E.L. BIERMAN.-
Post-heparin serum lecithinase in man and its positional specificity.
J. Up. Res. 1967 - 8 - 47.

- 6 - J. ETIENNE , J. POLONOVSKI.-
Evolution des lipides au cours de l'incubation du sérum.

I - Transformation du cholestérol et des lipides non phosphorés
Bull. Soc. Chim. Bio. 1959 - 41 - 805.

II - Identification de la glycérylphosphoryl choline
Bull. Soc. Chim. Bio. 1959 - 41 - 813.

III - Etude des phospholipides
Bull. soc. chim. Bio 1960 - 42 - 857.

IV - J. ETIENNE, M. AYRAULT, JARRIER, J. POLONOVSKI.-
Evolution des lipides des lipoprotéines isolées
Bull. Soc. Chim. Bio. 1963 - 45 - 561.

7 - J.A. GLOMSET, E.T. JANSEN, R. KENNEDY, DOBBINS.-
Role of plasma leuthin : cholesterol acyltransférase in the
metabolism of high density lipoproteins.
J. Lipid Res. 1966 - 7 - 638.

8 - J.A. GLOMSET.-
The plasma lecithin : cholesterol acyltransferase reaction.
J. Lipid Res. 1968 - 9 - 155.

9 - Y. AKANUMA, J. GLOMSET.-
In vitro incorporation of cholesterol ¹⁴C in very low density
lipoproteins cholesteryl esters.
J. Lipid Res. 1968 - 9 - 620.

10 - J. ETIENNE, A. GRUBER, J. POLONOVSKI.-
Phosphatidyl ethanolamine phospholipase A₂ du sérum de rat.
Bull. Soc. Chem. Bio. 1967 - 49 - 1751.

11 - J. FOLCH, I. ASCOLI, M. LEES, J.A. MEATH - F.N. LE. BARON
Preparation of lipide extracts from brain tissue
J. Bio. Chem. 1951 - 191 - 833.

12 - L. ZIEVE.-
Jaundice, hyperlipemia and hemolytic anemia : a heterofore
unrecognized syndrome associated with alcoholic fatty lever
and cirrhosis.
Ann. Int. Med. 1958 - 48 - 471.

13 - L. KESSEL.-
Acute transient hyperlipemia due to hepatopancreatic damage
in chronic alcoholics (Zieve's syndrome)
Ann. J. Med. 1962 - 32 - 747.

- 14 - J.P. GRILLAT, P. GAUCHER, J. LAURENT.

Syndrome de Zieve : à propos du rôle de l'alcool sur le métabolisme lipidique.

An. Med. Nancy 1965 - 4 - 834.

- 15 - J. GADRAT , L. DOUSTEBLAZY, A. PIBET, J.P. PASCAL, J. FREXIMOS.-

Syndrome de Zieve associé à une pancréatite calcifiante
Presse Med. 1967 - 75 - 789.

- 16 - F.J. SZYMANSKI , S.M. BLUEFARB.-

Nodular fat necrosis and pancreatic disease

Arch. Dermat. 1961 - 83 - 224.

- 17 - Cl. MENAGER.-

Cytosteatonecroses sous-cutanées au cours des maladies du pancréas.

Thèse de Médecine, Paris 1965.

- 18 - P. de GRACIANSKY, A. PARAF, E. TIMSIT.-

Le problème de la maladie de Weber-Christian.

An. Dermat. Syphil. 1966 - 93 - 503.

- 19 - G.V. MARINETTI.-

The action of phospholipase A on lipoproteins

Biochem. Biophys. Acta 1965 - 98 - 554.

- 20 - J. BELLEVILLE - J. CLEMENT.-

Activation par la trypsine de la phosphorylase A2 du suc pancréatique d'homme et de rat

Bull. Soc. Chem. Bio. 1968 - 50 - 1419.

- 21 - GH de HAAS, MM. POSTEMA , W. NIEUWENHUIZEN, LLM V an DEENEN.-

Purification and properties of an anionic zymogen of phospholipase
a from porcine pancreas

Biochem. Biophys. Acta 1968 - 159 - 118.

